بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده مهندسی شیمی

بررسی اثر عوامل مختلف بر تولید لیزین

دانشجو:

حمیده احمدلو

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته مهندسی شیمی گرایش بیوتکنولوژی

اردیبهشت ماه ۱۳۸۶

دانشکده مهندسی شیمی

بررسی اثر عوامل مختلف بر تولید لیزین

دانشجو:

حمیده احمدلو

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته مهندسی شیمی گرایش بیوتکنولوژی

استاد راهنما:

دکترفرشته نعیم‌پور

اردیبهشت ماه ۱۳۸۶

داوران محترم

1. **استاد مدعو داخلی: خانم دکتر فرزانه فیضی**
2. **استاد مدعو خارجی: جناب آقای دکتر سعید مقصودی**

تقدیم به

پدرم... تکیه‌گاه بی‌بدیل لحظه‌های نومیدی، نستوه و استوار!

مادرم.... آغوش مهر و عطوفت بی‌شائبه، نبض حیات و اشتیاق در رسیدن از هیچ تا کنون

خواهر و برادرم.....چشمان لبریز از ایمان، فارغ از هر خلل، بالهای نیرومند من تا همیشه...

همسرم، همراهی مهربان، دوستی بی‌مانند ، بارقه عشق بی‌دریغ و سایه‌سار عبور از تمام دلتنگی‌ها...

باسپاس و قدردانی از

خانم دکترفرشته نعیم پور

جناب آقای دکتر سعید مقصودی

خانم دکتر فرزانه فیضی

چکیده

در جهان امروز محصولات فرآیندهای تخمیری، خصوصا اسیدهای آمینه دارای جایگاه ویژه‌ای می‌باشند. لیزین به عنوان دومین اسیدآمینه مورد توجه، در فرآورده های خوراکی دارای ارزش خاصی است. پارامترها و شرایط عملیاتی مختلفی در میزان رشد و تولید محصول در میکروارگانیسم های تولید کننده لیزین نقش دارند. لذا لازم است پارامترهای موثر شناسایی شده و مقادیر بهینه آنها تعیین گردند. در این مطالعه بررسی اجمالی درباره اثر پارامترهای مختلف در رشد و تولید لیزین، انجام گردیده و سپس شرایط با استفاده از دو گونه باکتری کورینه‌باکتریوم گلوتامسیوم **PTCC 1603** و بروی‌باکتریوم فلاوم **PTCC 1532** و دو نوع محیط کشت سنتزی (گلوکز) و پیچیده (شیره خرما) بهینه سازی شده است. شیره خرما از محصولات عمده کشاورزی بوده و با توجه به مقدار ضایعات بالا و امکان رشد باکتری‌های تولید کننده لیزین به کمک شیره خرما، می‌توان با استفاده از آن به محصولی با کیفیت مناسب و صرفه اقتصادی بیشتر دست یافت. با توجه به مقادیر بهینه سازی شده در طی یک کشت ۶ روزه، در محیط کشت سنتزی حاوی ٪۱۰ گلوکز می‌توان برای کورینه باکتریوم گلوتامسیوم به مقدار تولید لیزین ۵/۷۳ گرم بر لیتر و برای بروی باکتریوم‌فلاوم به میزان تولید ۴/۹۸ گرم در لیتر رسید. در شرایط بهینه نهایی و به ترتیب در محیط‌های حاوی ٪۵ شیره خرما، تولید لیزین برای کورینه‌باکتریوم گلوتامسیوم به مقدار۵/۴۲ گرم بر لیتر و ٪۱۰ شیره خرما برای بروی‌باکتریوم فلاوم به مقدار تولید ۴/۳۵ گرم بر لیتر رسیده است.

واژه های کلیدی: لیزین، کورینه باکتریوم گلوتامسیوم، بروی باکتریوم فلاوم، شیره خرما، گلوکز، تاگوچی

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فصل۱ مقدمه ۱

فصل۲ آشنایی با لیزین ۵

۲-۱. معرفی لیزین ۶

۲-۲. مرور اجمالی بر تاریخچه مطالعات بر روی لیزین ۸

۲-۳. بررسی مسیر متابولیکی تولید لیزین ۱۷

۲-۳-۱. نگاه اجمالی ۱۷

۲-۳-۲. خروج لیزین از سلول ۲۰

۲-۳-۳. تحلیل فلاکسهای متابولیکی ۲۰

۲-۳-۴. تحلیل فلاکسهای متابولیکی تولید لیزین ۲۳

۲-۳-۵. بهینه سازی تولید لیزین ۲۶

۲-۴. روشهای اندازه گیری کیفی و کمی لیزین ۳۲

۲-۴-۱. روشهای کیفی ۳۲

۲-۴-۲. روشهای کمّی ۳۲

۲-۴-۲-۱. روش شناسایی فوتومتری چاینارد ۳۳

۲-۴-۲-۲. روش شناسایی مشتقات اسیدهای آمینه توسط HPLC ۳۴

فصل۳ تولید لیزین و پارامترهای موثر ۳۵

۳-۱. انواع روشهای تولید لیزین ۳۶

۳-۱-۱. روشهای شیمیایی ۳۶

۳-۱-۲. روشهای آنزیمی ۳۶

۳-۱-۳. روشهای تخمیری ۳۷

۳-۲. باکتری‌های تولیدکننده لیزین ۳۸

۳-۳. تکنولوژی تولید لیزین ۳۹

۳-۳-۱. سیستم غیر پیوسته ۴۱

۳-۳-۲. سیستم شبه پیوسته ۴۲

۳-۳-۳. سیستم پیوسته ۴۵

۳-۴. انواع محیط کشت ۴۶

۳-۵. پارامترهای موثر بر رشد و تولید لیزین ۵۰

۳-۵-۱. پارامترهای عملیاتی ۵۱

۳-۵-۱-۱. بررسی اثر هوادهی ۵۱

۳-۵-۱-۲. بررسی اثر همزدن ۵۵

۳-۵-۱-۳. بررسی اثرمقدار مایه تلقیح ۵۸

۳-۵-۱-۴. بررسی نرخ رقیق سازی بر تخمیر لیزین ۵۹

۳-۵-۱-۵. بررسی اثرpH اولیه ۶۰

۳-۵-۱-۶. بررسی اثر دما ۶۲
۳-۵-۲. پارامترهای خوراک ۶۳
۳-۵-۲-۱. بررسی اثر منبع کربن ۶۳
۳-۵-۲-۲. بررسی اثر منبع نیتروژن ۶۴
۳-۵-۲-۳. بررسی اثر کربنات کلسیم ۶۶
۳-۵-۲-۴. بررسی اثر تیامین هیدروکلراید و بیوتین ۶۷
۳-۵-۲-۵. بررسی اثرپتاسیم دی هیدروژن فسفات و سایر نمکهای معدنی ۶۹
۳-۵-۲-۶. بررسی اثر آمینو اسیدهای دیگر ۷۲
۳-۵-۲-۷. بررسی اثر ترئونین ۷۳
۳-۵-۲-۸. بررسی اثر افزایش اسید گلوکونیک به عنوان منبع کربن ثانویه ۷۳
۳-۵-۲-۹. بررسی اثر لیوسین در تولید لیزین ۷۴

فصل۴ روش‌ها و مواد مورد استفاده **۷۶**

۴-۱. مقدمه ۷۷
۴-۲. میکروارگانیسم و محیط کشت ۷۷
۴-۲-۱. انتخاب میکروارگانیسم ۷۷
۴-۲-۲. محیط کشت ۷۸
۴-۲-۲-۱. کشت جامد ۷۸
۴-۲-۲-۲. تهیه مایه تلقیح ۸۰
۴-۲-۲-۳. محیط کشت اصلی ۸۰
۴-۳. روش طراحی آزمایشات ۸۵
4-3-1. تاریخچه و مفهوم تاگوچی ۸۵
۴-۳-۲. مزایا و معایب روش تاگوچی ۸۷
۴-۴. روش‌های سنجش کمّی نتایج ۹۰
۴-۴-۱. روش تعیین میزان گلوکز مصرفی ۹۰
۴-۴-۱-۱. مبنای روش ۹۰
۴-۴-۱-۲. محتویات و مقادیر ۹۱
۴-۴-۱-۳. شرایط نگهداری و هشدارها ۹۱
۴-۴-۱-۴. مراحل انجام ۹۲
۴-۴-۱-۵. محاسبات ۹۲
۴-۴-۱-۶. محدوده اندازه‌گیری و عوامل مداخله‌گر ۹۳
۴-۴-۱-۷. رسم نمودار استاندارد ۹۳
۴-۴-۲. روش تعیین میزان توده سلولی ۹۴
۴-۴-۳. روش تعیین میزان لیزین ۹۵
۴-۴-۳-۱. رنگبری اولیه ۹۵
۴-۴-۳-۲. مراحل تست رنگ سنجی نین هیدرین ۹۶
۴-۵. مراحل آزمایشات تجربی ۹۸
۴-۵-۱. بررسی پارامتر های عملیاتی ۹۸
۴-۵-۲. بررسی مواد مغذی محیط کشت ۹۹
۴-۶. مواد و تجهیزات مورد استفاده ۹۹

فصل۵ نتایج و بحث **۱۰۳**
۵-۱. مقدمه ۱۰۴
۵-۲. نتایج آزمایشات محیط کشت سنتزی ۱۰۴
۵-۲-۱. نمودار رشد سلولی و تولید ۱۰۴
۵-۲-۲. بررسی پارامترهای محیط کشت ۱۰۶
۵-۲-۳. بررسی پارامترهای عملیاتی ۱۱۰
۵-۲-۴. بهینه‌سازی به کمک روش تاگوچی ۱۱۵
۵-۳. نتایج آزمایشات محیط کشت حاوی شیره خرما ۱۲۳
۵-۳-۱. بررسی رشد و تولید در شیره خرما ۱۲۴
۵-۳-۱-۲. نمودارهای کورینه باکتریوم گلوتامسیوم ۱۲۵
۵-۳-۱-۳. نمودارهای بروی باکتریوم فلاوم ۱۳۱
۵-۳-۲. بهینه سازی محیط کشت شیره خرما ۱۳۷

فصل۶ جمع‌بندی و پیشنهادات **۱۴۲**
۶-۱. مقدمه ۱۴۳
۶-۲. جمع‌بندی ۱۴۳
۶-۲-۱. نتایج کلی ۱۴۴
۶-۲-۲. پیشنهادات ۱۴۵

مراجع و مآخذ **۱۴۶**

فصل۷ پیوست **۱۵۰**
۷-۱. اطلاعات عددی منحنی‌های استاندارد ۱۵۱
۷-۲. اطلاعات عددی منحنی‌های رشد و تولید ۱۵۲
۷-۳. اطلاعات عددی بررسی اثر پارامترها و مواد مغذی ۱۵۳
۷-۴. نتایج تاگوچی محیط کشت سنتزی ۱۵۶
۷-۵. اطلاعات عددی آزمایشات رشد و تولید در شیره خرما ۱۵۸
۷-۶. تاگوچی شیره خرما ۱۶۹

فهرست اشکال

عنوان | صفحه

فصل۱ مقدمه ۱

شکل۱-۱. بازار تولید اسیدهای آمینه و لیزین ۴

فصل۲ آشنایی با لیزین ۵

شکل۲-۱. شکل مسیر متابولیکی تولید لیزین در پروکاریوتها ۱۹

شکل۲-۲. مدل و توپولوژی تولید lysE ۲۰

شکل۲-۳. روند فیزیولوژیکی تولید و خروج لیزین از سلول ۲۲

شکل۲-٤. روش بهسازی شده تولید لیزین در گونه اکسوتروف کورینه باکتریوم ۲۸

شکل۲-۵. روش بهسازی شده تولید لیزین در گونه مقاوم نسبت به AEC در بروی باکتریوم ۲۹

فصل۳ تولید لیزین و پارامترهای موثر ۳۵

شکل۳-۱. اثر هوادهی بر تولید لیزین و مقدار قند باقیمانده ۵۲

شکل۳-۲. تغییرات شدت مصرف ویژه سوبسترا ، شدت ویژه تولید محصول ۵۵

شکل۳-۳. اثر همزدن بر تولید لیزین و مقدار قند باقیمانده ۵۶

شکل۳-٤. تغییرات شدت مصرف ویژه سوبسترا ، شدت ویژه تولید محصول ۵۷

شکل۳-۵. اثر حجم مایه تلقیح بر تولید لیزین و مقدار قند باقیمانده ۵۹

شکل۳-۶. تغییرات شدت مصرف ویژه سوبسترا ، شدت ویژه تولید محصول ۶۰

شکل۳-۷. اثر pH اولیه بر تولید لیزین و مقدار قند باقیمانده ۶۱

شکل۳-۸. اثر دما بر تولید لیزین و مقدار قند باقیمانده ۶۳

شکل۳-۹. اثر منبع کربن بر رشد و تولید لیزین ۶۴

شکل۳-۱۰. اثرغلظت سولفات آمونیوم (منبع نیتروژن) بر رشد و تولید لیزین ۶۵

شکل۳-۱۱. اثر کربنات کلسیم بر تولید لیزین و pH نهایی محیط ۶۶

شکل۳-۱۲. اثر بیوتین بر روی رشد و تولید لیزین ۶۸

شکل۳-۱۳. اثر تیامین هیدروکلراید بر روی رشد و تولید لیزین ۶۸

شکل۳-۱٤. اثر پتاسیم دی هیدروژن فسفات بر روی رشد و تولید ۷۰

شکل۳-۱۵. اثر نمکهای معدنی بر رشد میکروارگانیسم و تولید لیزین ۷۱

شکل۳-۱۶. اثر سولفات آهن و کلرید منگنز بر رشد میکروارگانیسم و تولید لیزین ۷۱

شکل۳-۱۷. اثر باکتریوکاسامینواسید بر تولید لیزین و مقدار قند باقیمانده ۷۲

فصل۴ روش‌ها و مواد مورد استفاده ۷۶

شکل٤-۱. نمونه کشت ۲۴ ساعته، کورینه باکتریوم و بروی باکتریوم ۸۰

شکل٤-۲. نمودار استاندارد گلوکز ۹۴

شکل٤-٣. نمودار استاندارد لیزین..... ۹۸

فصل۵ نتایج و بحث **۱۰۳**

شکل۵-۱. نمودار رشد میکروبی، تولید لیزین و میزان قند باقیمانده برای کورینه باکتریوم ۱۰۵
شکل۵-۲. نمودار رشد میکروبی، تولید لیزین و میزان قند باقیمانده برای بروی باکتریوم فلاوم. ۱۰۶
شکل۵-۳. نمودار رشد و تولید - کورینه باکتریوم (۱: سولفات آمونیوم، ۲: کلرید آمونیوم)..... ۱۰۷
شکل۵-٤. نمودار رشد و تولید-بروی باکتریوم فلاوم (۱: سولفات آمونیوم، ۲: کلرید آمونیوم)..... ۱۰۸
شکل۵-۵. نمودار رشد و تولید- کورینه باکتریوم (۱: حاوی آمینواسیدها ۲: فاقد آمینواسیدها). ۱۰۹
شکل۵-۶. نمودار رشد و تولید - بروی‌باکتریوم (۱: حاوی آمینواسیدها ۲: فاقد آمینواسیدها)..... ۱۱۰
شکل۵-۷. تغییرات گلوکز باقیمانده و تولید -حجم مختلف محیط کشت (کورینه باکتریوم) ۱۱۱
شکل۵-۸. تغییرات گلوکز باقیمانده و تولید- حجم‌های مختلف محیط کشت (بروی باکتریوم) .. ۱۱۲
شکل۵-۹. تغییرات گلوکز باقیمانده و تولید لیزین در pH های اولیه مختلف (کورینه باکتریوم). ۱۱۳
شکل۵-۱۰. تغییرات گلوکز باقیمانده و تولید لیزین در pH های اولیه مختلف (بروی باکتریوم) ... ۱۱۳
شکل۵-۱۱. تغییرات گلوکز باقیمانده و تولید -نسبت مایه تلقیح‌های مختلف (کورینه باکتریوم) ۱۱۴
شکل۵-۱۲. تغییرات گلوکز باقیمانده و تولید- نسبت مایه تلقیح‌های مختلف (بروی باکتریوم) .. ۱۱۵
شکل۵-۱۳. نتایج نهایی بهینه سازی به روش تاگوچی (کورینه باکتریوم) ۱۱۷
شکل۵-۱٤. نتایج نهایی بهینه سازی به روش تاگوچی (بروی باکتریوم فلاوم) ۱۱۸
شکل۵-۱۵. تغییرات شدت ویژه تولید لیزین نسبت به زمان- کورینه باکتریوم-٪۱۸ شیره خرما۱۲۶
شکل۵-۱۶. تغییرات رشد ویژه نسبت به زمان- کورینه باکتریوم-٪۱۸ شیره خرما..... ۱۲۶
شکل۵-۱۷. تغییرات شدت ویژه تولید لیزین نسبت به زمان- کورینه باکتریوم-٪۱۰ شیره خرما۱۲۷
شکل۵-۱۸. تغییرات رشد ویژه نسبت به زمان- کورینه باکتریوم-٪۱۰ شیره خرما ۱۲۷
شکل۵-۱۹. تغییرات شدت ویژه تولید لیزین نسبت به زمان- کورینه باکتریوم-٪۵ شیره خرما ۱۲۸
شکل۵-۲۰. تغییرات رشد ویژه نسبت به زمان- کورینه باکتریوم-٪۵ شیره خرما..... ۱۲۸
شکل۵-۲۱. تغییرات شدت ویژه تولید به زمان- کورینه باکتریوم-٪۵ شیره خرما و٪۱ گلوکز ۱۲۹
شکل۵-۲۲. تغییرات رشد ویژه نسبت به زمان- کورینه باکتریوم-٪۵ شیره خرما و٪۱ گلوکز..... ۱۲۹
شکل۵-۲۳. شدت ویژه تولید به زمان- کورینه باکتریوم-٪۵ شیره خرما و٪۱ سولفات آمونیوم. ۱۳۰
شکل۵-۲٤. رشد ویژه نسبت به زمان- کورینه باکتریوم-٪۵ شیره خرما و٪۱ سولفات آمونیوم .. ۱۳۰
شکل۵-۲۵. تغییرات شدت ویژه تولید لیزین نسبت به زمان- بروی باکتریوم-٪۱۸ شیره خرما ۱۳۲
شکل۵-۲۶. تغییرات رشد ویزه نسبت به زمان- بروی باکتریوم-٪۱۸ شیره خرما..... ۱۳۲
شکل۵-۲۷. تغییرات شدت ویژه تولید لیزین نسبت به زمان- بروی باکتریوم-٪۱۰شیره خرما.. ۱۳۳
شکل۵-۲۸. تغییرات رشد ویژه نسبت به زمان- بروی باکتریوم-٪۱۰ شیره خرما ۱۳۳
شکل۵-۲۹. تغییرات شدت ویژه تولید لیزین نسبت به زمان- بروی باکتریوم-٪۵ شیره خرما .. ۱۳۴
شکل۵-۳۰. تغییرات رشد ویژه نسبت به زمان- بروی باکتریوم-٪۵ شیره خرما..... ۱۳۴
شکل۵-۳۱. تغییرات شدت ویژه تولید به زمان- بروی باکتریوم-٪۵ شیره خرما و ٪۱ گلوکز..... ۱۳۵
شکل۵-۳۲. تغییرات رشد ویژه نسبت به زمان- بروی باکتریوم-٪۵ شیره خرما و ٪۱ گلوکز ۱۳۵

شکل۵-۳۳. شدت ویژه تولید نسبت به زمان- بروی باکتریوم-٪۵ شیره و ٪۱ سولفات آمونیوم ۱۳۶
شکل۵-۳٤. رشد ویژه نسبت به زمان- بروی باکتریوم-٪۵ شیره خرما و ٪۱ سولفات آمونیوم... ۱۳۶
شکل۵-۳۵. نتایج بهینه سازی محیط کشت شیره خرما- کورینه باکتریوم گلوتامسیوم ۱۳۸
شکل۵-۳۶. نتایج بهینه سازی محیط کشت شیره خرما- بروی باکتریوم فلاوم ۱۳۹

فصل۶ جمع‌بندی و پیشنهادات **۱۴۲**

مراجع و مآخذ **۱۴۶**

فصل۷ پیوست **۱۵۰**
شکل۷-۱. ورودی‌های برنامه برای اجرای روش تاگوچی محیط کشت سنتزی (کورینه باکتریوم) ۱۵۶
شکل۷-۲. نتایج نهایی بهینه سازی تاگوچی محیط کشت سنتزی (کورینه باکتریوم) ۱۵۷
شکل۷-۳. ورودی‌های برنامه برای اجرای روش تاگوچی محیط کشت سنتزی (بروی باکتریوم) . ۱۵۷
شکل۷-٤. نتایج نهایی بهینه سازی به روش تاگوچی محیط کشت سنتزی (بروی باکتریوم)..... ۱۵۸
شکل۷-۵. نمودار رشد و تولید لیزین در شیره خرما ٪۱۸- کورینه باکتریوم گلوتامسیوم ۱۵۹
شکل۷-۶. نمودار رشد و تولید لیزین در شیره خرما ٪۱۸- بروی باکتریوم فلاوم ۱۶۰
شکل۷-۷. نمودار رشد و تولید لیزین در شیره خرما ٪۱۰- کورینه باکتریوم گلوتامسیوم ۱۶۱
شکل۷-۸. نمودار رشد و تولید لیزین در شیره خرما ٪۱۰- بروی باکتریوم فلاوم ۱۶۲
شکل۷-۹. نمودار رشد و تولید لیزین در شیره خرما ٪۵- کورینه باکتریوم گلوتامسیوم ۱۶۳
شکل۷-۱۰. نمودار رشد و تولید لیزین در شیره خرما ٪۵- بروی باکتریوم فلاوم ۱۶۴
شکل۷-۱۱. نتایج نمودار رشد و تولید لیزین در شیره خرما ٪۵ و ٪۱ گلوکز- کورینه باکتریوم.... ۱۶۵
شکل۷-۱۲. نمودار رشد و تولید لیزین در شیره خرما ٪۵ و ٪۱ گلوکز - بروی باکتریوم فلاوم ۱۶۶
شکل۷-۱۳. نمودار رشد و تولید- شیره خرما ٪۵ و ٪۱ سولفات آمونیوم- کورینه باکتریوم..... ۱۶۷
شکل۷-۱٤. نمودار رشد و تولید- شیره خرما ٪۵ و ٪۱ سولفات آمونیوم - بروی باکتریوم..... ۱۶۸
شکل۷-۱۵. ورودی‌های برنامه تاگوچی محیط کشت شیره خرما (کورینه باکتریوم) ۱۶۹
شکل۷-۱۶. خروجی‌های برنامه برای اجرای روش تاگوچی محیط کشت خرما (کورینه باکتریوم) ۱۶۹
شکل۷-۱۷. ورودی‌های برنامه تاگوچی محیط کشت شیره خرما (بروی باکتریوم فلاوم) ۱۷۰
شکل۷-۱۸. خروجی‌های برنامه تاگوچی محیط کشت شیره خرما (بروی باکتریوم فلاوم..... ۱۷۰

فهرست جداول

عنوان | صفحه

فصل۱ مقدمه ۱

فصل۲ آشنایی با لیزین ۵
جدول۲-۱. خواص کلی لیزین ۷
جدول۲-۲. بررسی اجمالی مطالعات بر روی لیزین..... ۱۵
جدول۲-۳. ادامه جدول بررسی اجمالی مطالعات بر روی لیزین..... ۱۶
جدول۲-۴. نواحی تخمیر میکروبی در تولید لیزین..... ۲۴

فصل۳ تولید لیزین و پارامترهای موثر ۳۵
جدول۳-۱. محیط کشتهای سنتزی استفاده شده تا کنون ۴۸
جدول۳-۲. ترکیب درصد شیره خرما ۵۰

فصل۴ روش‌ها و مواد مورد استفاده ۷۶
جدول۴-۱. مواد موجود در پودر NA تجاری ۷۹
جدول۴-۲. محیط کشت مایع تلقیح ۸۱
جدول۴-۳. محیط کشت مورد استفاده برای کورینه باکتریوم گلوتامسیوم ۸۴
جدول۴-۴. محیط کشت مورد استفاده برای بروی باکتریوم فلاوم..... ۸۴
جدول۴-۵. جدول مقادیر تاگوچی..... ۸۶
جدول۴-۶. طراحی آزمایشات بر طبق روش تاگوچی..... ۸۹
جدول۴-۷. مواد تشکیل دهنده کیت تشخیص کمّی گلوکز ۹۱
جدول۴-۸. مواد مورد استفاده ۱۰۰
جدول۴-۹. تجهیزات مورد استفاده..... ۱۰۱
جدول۴-۱۰. لوازم مورد استفاده..... ۱۰۲

فصل۵ نتایج تجربی ۱۰۳
جدول۵-۱. مقادیر سطوح مورد استفاده در بهینه سازی..... ۱۱۶
جدول۵-۲. طراحی آزمایشات بر طبق روش تاگوچی ۱۱۶
جدول۵-۳. شرایط بهینه رشد و تولید لیزین برای کورینه باکتریوم در محیط کشت سنتزی..... ۱۱۹
جدول۵-۴. شرایط بهینه رشد و تولید لیزین برای بروی باکتریوم در محیط کشت سنتزی ۱۲۱
جدول۵-۵. طراحی آزمایشات اولیه شیره خرما..... ۱۲۴
جدول۵-۶. مقادیر سطوح برای محیط کشت شیره خرما..... ۱۳۸
جدول۵-۷. شرایط بهینه رشد و تولید لیزین برای کورینه باکتریوم در شیره خرما ۱۴۰
جدول۵-۸. شرایط بهینه رشد و تولید لیزین برای بروی باکتریوم در شیره خرما ۱۴۰

فصل۶ جمع‌بندی و ارائه پیشنهادات ۱۴۲

فصل۷ پیوست الف **۱۵۰**
جدول۷-۱. اطلاعات عددی منحنی استاندارد لیزین ۱۵۱
جدول۷-۲. اطلاعات عددی منحنی استاندارد گلوکز ۱۵۱
جدول۷-۳. اطلاعات عددی منحنی رشد وتولید لیزین، کورینه باکتریوم گلوتامسیوم ۱۵۲
جدول۷-۴. اطلاعات عددی منحنی رشد و تولید لیزین، بروی باکتریوم فلاوم ۱۵۲
جدول۷-۵. اطلاعات عددی منحنی اثر منابع نیتروژن، کورینه باکتریوم گلوتامسیوم ۱۵۳
جدول۷-۶. اطلاعات عددی اثر منبع نیتروژن، بروی باکتریوم فلاوم ۱۵۳
جدول۷-۷. اطلاعات عددی منحنی اثر آمینواسیدها، کورینه باکتریوم گلوتامسیوم ۱۵۴
جدول۷-۸. اطلاعات عددی منحنی اثر آمینواسیدها، بروی باکتریوم فلاوم ۱۵۴
جدول۷-۹. اطلاعات عددی منحنی اثر حجم محیط کشت، کورینه باکتریوم گلوتامسیوم..... ۱۵۴
جدول۷-۱۰. اطلاعات عددی منحنی اثر حجم محیط کشت، بروی باکتریوم فلاوم..... ۱۵۵
جدول۷-۱۱. اطلاعات عددی منحنی اثر pH، کورینه باکتریوم گلوتامسیوم..... ۱۵۵
جدول۷-۱۲. اطلاعات عددی منحنی اثر pH بروی باکتریوم فلاوم ۱۵۵
جدول۷-۱۳. اطلاعات عددی منحنی اثر حجم مایع تلقیح، کورینه باکتریوم گلوتامسیوم..... ۱۵۵
جدول۷-۱۴. اطلاعات عددی منحنی رشد و تولید لیزین، بروی باکتریوم فلاوم..... ۱۵۵
جدول۷-۱۵. اطلاعات عددی رشد و تولید لیزین- شیره خرما ٪۱۸- کورینه باکتریوم ۱۵۸
جدول۷-۱۶. اطلاعات عددی رشد و تولید لیزین در شیره خرما ٪۱۸- بروی باکتریوم..... ۱۵۹
جدول۷-۱۷. اطلاعات عددی رشد و تولید لیزین- شیره خرما ٪۱۰- کورینه باکتریوم ۱۶۰
جدول۷-۱۸. اطلاعات عددی رشد و تولید لیزین در شیره خرما ٪۱۰- بروی باکتریوم ۱۶۱
جدول۷-۱۹. اطلاعات عددی رشد و تولید لیزین- شیره خرما ٪۵- کورینه باکتریوم ۱۶۲
جدول۷-۲۰. اطلاعات عددی رشد و تولید لیزین در شیره خرما ٪۵- بروی باکتریوم ۱۶۳
جدول۷-۲۱. اطلاعات رشد و تولید لیزین-شیره خرما ٪ ۵ و ٪۱ گلوکز - کورینه باکتریوم ۱۶۴
جدول۷-۲۲. اطلاعات رشد و تولید لیزین در شیره خرما ٪ ۵و ٪۱ گلوکز- بروی باکتریوم ۱۶۵
جدول۷-۲۳. اطلاعات رشد و تولید - شیره خرما ٪ ۵و ٪۱ سولفات آمونیوم- کورینه باکتریوم.... ۱۶۶
جدول۷-۲۴. رشد و تولید لیزین در شیره خرما ٪ ۵و ٪۱ سولفات آمونیوم- بروی باکتریوم ۱۶۷

مراجع و مآخذ **۱۴۶**

فهرست علائم اختصاری

غلظت بیومس	X (g/l)
غلظت سوبسترا	S (g/l)
غلظت لیزین	L (g/l)
غلظت ترئونین	Thr (g/l)
غلظت محلول خوراک	S_0 (g/l)
غلظت اکسیژن محلول	C $(\%)$
شدت خوراک‌دهی	F (l/hr)
حجم بیوراکتور	V (lit)
شدت رقیق سازی	D (hr^{-1})
شدتهای ویژه بر حسب بازه‌های زمانی مختلف	μ,η (hr^{-1})
ضرایب ثابت (بسته به تعداد واکنش‌های درگیر)	$k_1 ... k_{16}$
ضریب انتقال اکسیژن حجمی	$k_l a$ (hr^{-1})
غلظت اکسیژن اشباع	O^* (g/l)
غلظت اکسیژن در مایع	O(g/l)
نرخ ویژه مصرف اکسیژن توسط سلول	Q_o (g/l)
فشار جزئی اکسیژن	P_o (atm)
ثابت هنری	H_o (۰/۷۹۰۶atm/mM in $25°C$)
دبی هوا	$F_g(vvm)$
دور همزن	N (rpm)
غلظت سوبسترا	$S_f(gr.l^{-1})$

فصل۱

مقدمه

نزدیک به ۵۰ سال است که از میکروارگانیسمها برای تولید آمینو اسیدهای مختلف استفاده میشود. ارزش اقتصادی این اجزاء سلولی در تولید بسیار برجسته بوده و بنابراین همراه با رشد تقاضا، تلاش در جهت بهینه سازی گونه‌ها و توسعه تکنولوژی تولید رو به افزایش است. کل مصرف جهانی آمینو اسیدها در حدود دو میلیون تن در سال تخمین زده شده است. بیشترین میزان تولید مربوط به گلوتامیک اسید بوده و برابر ۹۰۰۰۰۰ تن می‌باشد. پس از گلوتامیک اسید لیزین با میزان تولید ۴۲۰۰۰۰ تن در سال و متیونین با میزان تولید ۳۵۰۰۰۰ تن در سال قرار دارند. دلیل این افزایش تقاضا را میتوان در تغییرات ایجاد شده در سیستم های تغذیه‌ای جستجو کرد. امروزه استفاده از آمینو اسیدها خصوصا لیزین در افزودنی‌های خوراکی، مکملهای غذایی، مواد درمانی و به عنوان مواد پیش‌ساز در تولید پپتیدها و مواد زیست شیمیایی و... رایج شده است[۱].

نخستین بار، لیزین در سال ۱۸۸۹ شناسایی و در متابولیسم بسیاری از موجودات اثری از آن یافت شد. امروزه همچنان بیشترین میزان مصرف لیزین در خوراک دام و طیور می‌باشد. بر طبق گزارشات اقتصادی دولت امریکا، سالانه بیش از ٪۸۳ از تولید لیزین در جهت بالا بردن کیفیت غذایی دام و طیور و مواد خوراکی جانبی مثل داروهای پرورش اندام به‌کار میرود. ال- لیزین به‌عنوان یک جزء در محلولهای داروئی (وریدی) پزشکی و در پلیمرهای زیست تخریب پذیر به‌کار گرفته می شود. همچنین اخیرا از آن بعنوان پایه ای جهت ساخت پلیمرهای فوق جاذب و نیز ساخت الیاف مصنوعی بر پایه کوپلیمر اسید لاکتیک/ لیزین استفاده شده است[۲].

پیشرفتهای عمده در جهت افزایش تولید در فرآیندهای تخمیری، معمولا وابسته به ایجاد گونه‌های نوترکیب جدید با توانایی‌های بالاتر است. تا سال ۱۹۵۰ هیچ فرآیند شیمیایی مناسبی برای تولید آمینو اسیدهای طبیعی، به غیرازاستخراج از پروتئین به کمک فرآیندهای هیدرولیز آنزیمی و شیمیایی وجود نداشت.

برای نخستین بار کینوشیتا[1] یک گونه وحشی میکروارگانیسم کورینه‌باکتریوم گلوتامیسوم (باکتری اصلی تولید لیزین) را شناسایی نمود و سپس در جهت بالا بردن حجم گلوتامیک اسید تولیدشده از گلوکز در این باکتری مطالعات خود را گسترش داد. در ادامه کشفیاتی در مورد باکتری‌های تولید کننده لیزین انجام شد [۱].

باید توجه داشت که فرآیندهای تخمیری در مقایسه با روشهای تولید شیمیایی دارای مزایای

[1] Kinoshita

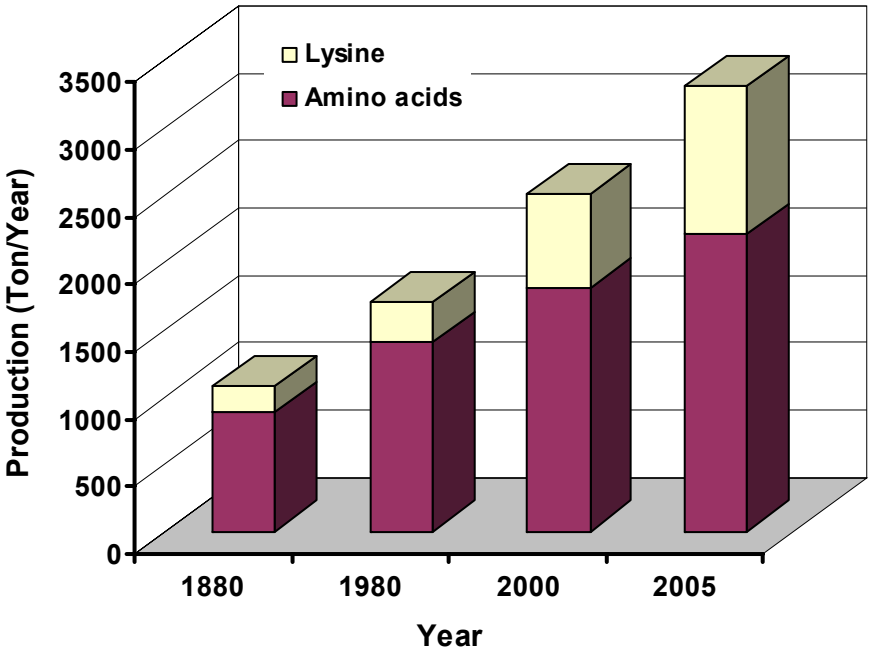
برجسته‌ای هستند که از آن جمله، میتوان به تولید محصولات فعال نوری مورد نیاز در واکنشهای بیولوژیکی (آمینواسیدهایی به شکل L –فرم) با استفاده از منابع ارزان قیمت کربن و نیتروژن اشاره نمود. تحقیقات گسترده‌ای به منظور بهبود فرآیندهای تخمیری در جهت کاهش قیمتهای تولید محصول و افزایش میزان تولید انجام شده است. این تحقیقات اغلب شامل: بالا بردن راندمان تولید متابولیتهای دلخواه، حذف متابولیتهای نامطلوب، بهینه سازی استفاده از منابع نیتروزنی و کربنی ارزان قیمت و یا تغییر مورفولوژی سلولی به حالتی که جداسازی ارگانیسم از محصول نهایی تسهیل گردد، است [۳].

فام[1] پارامترهای دیگر مثل محیط کشت و خواص فیزیکی که به شدت تولید را تحت تاثیر قرار می‌دهد، مورد توجه قرار داد. به دلیل اینکه هر باکتری دامنه خاصی از شرایط را برای تولید لیزین نیاز دارد، تحقیق در مورد اثر این موارد بر روی تولید ضروری می‌نمود. لیو[2] روی بهینه سازی شرایط و پارامترهای مختلف موثر بر روی تولید لیزین با استفاده از ملاس و گونه های کورینه‌باکتریوم تحقیق نمود و به راندمان بالایی در تولید رسید. فعالیتهای گسترده ای در زمینه باکتری‌های تولیدکننده، انجام شده است که در فصول بعدی به آنها اشاره می‌کنیم.

استفاده از لیزین در صنایع مختلف باعث افزایش روزافزون مصرف این ماده در بازار جهانی گردیده به گونه‌ای که مصرف این ماده در سال ۲۰۰۳ میلادی حدود ۶۰۰۰۰۰ تن در سال برآورد می‌شود و این مصرف با نرخ رشد ۵ تا ۷ درصد در سال در حال افزایش می‌باشد. در شکل ۱-۱ بازار تولید لیزین تا سال ۲۰۰۶ نشان داده شده است. ٪۶۶ از این مقدار در صنایع غذایی، ٪۳۱ به عنوان افزودنی خوراکی و ٪۴ در داروها و لوازم آرایشی-بهداشتی استفاده می‌گردد[۴].[3]

در ایران نیز لیزین در صنایع و محصولات مختلف مورد استفاده می‌باشد. اکثر نیاز کشور از طریق واردات تامین می‌گردد و اخیرا اقداماتی در جهت احداث صنایع مربوطه انجام گرفته است. به دلیل بهره‌وری اقتصادی بالا و نیاز جهانی به این ماده، تولید آن و ایجاد تکنولوزی مناسب تولید لیزین، از اولویتهای وزارت صنایع است. از سویی وجود منبع قندی و نیتروژنی صنعتی، مثل پساب کارخانجات قند و شکر (ملاس و شیرابه نیشکر)، شیره خرما و پساب کارخانجات پنیر و ...، راه را برای بررسی بر روی تولید بهینه این ماده از منابع ارزان قیمت هموار می‌نماید [۵].

[1] Pham et al. 1992
[2] Liu 1986
[3] Basit et al., 2004



شکل۱-۱. بازار تولید اسیدهای آمینه و لیزین [۱]

در این مطالعه به طور کلی به بررسی روشهای مختلف تولید لیزین و چگونگی مراحل رسیدن به میزان تولید بهینه لیزین خواهیم پرداخت. پس از آن روشهای یافتن پارامترهای موثر بر رشد و تولید و چگونگی انجام آزمایشات و تحلیل نتایج را بررسی خواهیم کرد. در انتها نیز اطلاعات حاصل از آزمایشات تجربی را تحلیل نموده و به نتیجه گیری پرداخته خواهد شد.. آنچه در این مجموعه خواهید دید، عبارتند از:

۱. لیزین، تاریخچه مطالعات تاکنون و روشهای تولید امروزی آن
۲. ارائه روشهای انجام آزمایشات و مواد مورد نیاز
۳. بیان نتایج آزمایشات و بحث و بررسی بر روی اطلاعات تجربی
۴. جمع‌بندی و پیشنهادات